

ヘマトコッカス藻色素の F344 ラットによる 13 週間反復混餌投与毒性試験

小野 敦[#]・関田清司・斉藤 実・梅村隆志・小川幸男・降矢 強・金子豊蔵・井上 達

A 13-week subchronic oral toxicity study of haematococcus color in F344 rats

Atsushi Ono[#], Kiyoshi Sekita, Minoru Saitoh, Takashi Umemura, Yukio Ogawa,
Tsuyoshi Furuya, Toyozo Kaneko and Tohru Inoue

A 13-week oral repeated dose toxicity study of haematococcus color, a food additive mainly composed of astaxanthin, was conducted in male and female F344 rats. Rats were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 males and 10 females and given CRF-1 powder diet containing 0%, 0.025%, 0.075%, and 0.25% haematococcus color, correspond to 0%, 0.5%, 1.5%, and 5% as the product. None of the animals died during the administration period. There were no exposure-related changes in body weight gain or food consumptions. Serum biochemical examinations showed dose-related increase in cholesterol, but the differences were slight and not defined as an adverse effect. No effects related to treatment were noted in hematological examinations and organ weights, and no abnormalities that could be ascribed to exposure to haematococcus color were observed in histopathological examinations. In conclusion, ingestion of haematococcus color in the diet for 13 weeks does not cause any toxicological changes in F344 rats.

Keywords: food additive, haematococcus color, astaxanthin, F344 rats, subchronic toxicity study

緒 言

天然物由来の食品添加物（天然添加物）の需要は、近年の合成添加物に対する使用規制や消費者の自然志向などより増大の傾向にある。しかし天然添加物の多くは、それ自体もしくはその原料が、長年食用に供されてきた経験に基づいて使用されているが、その安全性について動物実験などに基づいた科学的な検討の乏しいものが少なくない。平成7年の食品衛生法及び栄養改善法の一部改正より、新たに開発される食品添加物については、天然添加物であっても合成添加物と同様に指定制度の対象となったが、従来使用されてきた天然添加物については既存添加物名簿に記載され毒性試験の実施などを義務付けることなく引き続きその使用が認められている¹⁾。

ヘマトコッカス藻色素は、アスタキサンチンを主成分とする橙色～赤色色素で、主として魚肉ねり製品や油脂製品などの着色料として使用される。アスタキサンチンは、鯛、海老および蟹など水産物の赤色の主成分をなす物質で、色

調、熱安定性にすぐれており天然食用色素としての有用性が期待されてきた。さらに近年、βカロテンの類縁体であるアスタキサンチンが、活性酸素消去能^{2,3,4)}や免疫賦活能^{5,6)}および発がん抑制作用^{7,8)}などを有することが報告され、単に食品用色素としてだけではなくその機能からも再び注目されている。これまでアスタキサンチンは、オキアミやアメリカザリガニなどの甲殻類より抽出されたが、色素濃度の均一性や原料特有の臭気など品質および経済性などの問題から食用色素としての実用化には至っていない。一方、*Haematococcus pluvialis*（ヘマトコッカス藻）はアスタキサンチンを高産生することが従来より知られる微細藻類で、近年、培養法や抽出法の改良により、その抽出色素がアスタキサンチン系食品着色料として実用化された⁹⁾。現在のところ我が国では、食品添加物としてほとんど使用されていないが、優れた色調と機能性を有する天然着色料として、今後の使用増加が予想される。

ヘマトコッカス藻色素についてはこれまで毒性試験および毒性に関する報告はない。また原料のヘマトコッカス藻が食用に供されることもないため、早急に毒性の検討が必要であると考えられる。そこで今回、ラットを用いてヘマトコッカス藻色素混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施したので報告する。

[#] To whom correspondence should be addressed: Atsushi Ono; Division of Toxicology, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 1588501, Japan; Tel:+81-3-3700-9646; Fax:+81-3-3700-2348; E-mail:atsushi@nihs.go.jp

実験材料および方法

1. 被験物質および投与方法

ヘマトコッカス藻色素はヤエガキ発酵株式会社(姫路)より供与されたものを用いた。ヘマトコッカス藻色素は、コナヒゲムシ科ヘマトコッカス (*Haematococcus C.A. AGARCH*) の全藻を乾燥後、粉碎し、含水エタノール、アセトン、ヘキサンもしくはこれらを2種類以上混合したもので抽出し溶媒を除去したものであり、特有の臭気を有する暗褐色のペースト状液体である。ヘマトコッカス藻色素は、水にはほとんど溶けず、エーテル、アセトン、クロロホルム、ベンゼンなどに溶解する。吸湿性はなく、耐熱性に優れるが、紫外線および可視光線により容易に退色する。ヘマトコッカス藻色素製剤は大豆油にヘマトコッカス藻色素を5%となるよう溶解したものである。本試験では、添加剤である大豆油の影響を除外するため、ヘマトコッカス藻色素原体(100%)を用い、投与は被験物質の使用目的が食品添加物であることから粉末飼料による混餌により行った。色素添加飼料の調整は、ヘマトコッカス藻色素を適量のアセトンに溶解して基礎飼料に添加し、一晚ドラフト内でアセトンを除去した後、基礎飼料と混合してそれぞれ規定量の添加飼料とした。添加飼料の調整は1回/2週行い、調整した添加飼料は4℃に維持された飼料保管室に遮光して保存した。

2. 投与用量

本試験では食品添加物製剤としての影響を調べることを目的としたため、用量設定は製剤としての量を基準に行った。すなわち食品添加物の混餌投与試験における上限が5%とされている¹⁰⁾ことから、製剤として5%に相当する量(0.25%ヘマトコッカス藻色素)を上限とした。本試験を行うにあたり、添加飼料中の色素安定性および動物の被験物質混合飼料の忌避を確認する目的で、0.25%ヘマトコッカス藻色素を最高用量とする2週間の予備試験を行った。またヘマトコッカス藻色素をアセトンに溶解して飼料に混じるため、同量のアセトンを添加した対照群を設けた。この結果、いずれの群においても体重、摂餌量に基礎飼料対照群とのあいだに差は認められなかった。これらより本試験におけるヘマトコッカス藻色素の最高用量は、0.25%(H群、ヘマトコッカス藻色素製剤5%)とし、以下、0.075%(M群、同1.5%)、0.025%(L群、同0.5%)および対照群(C群)を加えた4群で試験を行った。また、添加飼料中の色素は、光(特に紫外光)により容易に退色するが、暗所においては室温および冷蔵のいずれの条件下においても安定であった。試験期間中は、給餌器に蓋をして遮光した。

3. 動物および飼育条件

5週齢のF344ラット(SPF)雌雄を日本チャールス・リ

バー(神奈川)より購入し、基礎飼料(オリエンタル酵母(株)CRF-1粉末飼料)で1週間馴化飼育した後、無作為に雌雄各4群(1群10匹)に分け、それぞれを試験に供した。動物は雌雄とも透明なプラスチックケージ(幅26cm、長さ42cm、高さ17cm)に5匹ずつ収容し、床敷はソフトチップ(三協ラボサービス社(東京))を用い、週2回交換を行った。試験期間中、飲料水として水道水を自由に摂取させた。試験は室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間明暗サイクルの条件下の飼育室にて行った。

4. 検査項目および方法

雌雄各3群を被験物質投与群とし、それぞれ規定量のヘマトコッカス藻色素を混合した粉末飼料を13週間、懸架式粉末給餌器を用いて自由に摂取させた。対照群として雌雄各1群にはヘマトコッカス藻色素を含まない基礎飼料を同期間自由に摂取させた。試験期間中、一般状態および死亡動物の有無を連日観察し、体重および摂餌量の測定を週1回行った。投与開始13週後に全動物を一晚絶食させた後、エーテル麻酔下に眼窩静脈叢より採血し、放血後剖検し以下に示す検査を行った。

採取した血液について、希釈血液を用いてSysmex M2000(東亜医用電子、兵庫)により赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、血小板数(Plt)、及び白血球数(WBC)を測定した。またライト染色を施した血液塗抹標本を作成し白血球の型別分類を、Microx HEG-120A(オムロン、東京)を用いて測定した。遠心分離により得た血清試料を用いて、総蛋白量(TP、ビュレット法)、アルブミン量(Alb、BCG法)、アルブミン・グロブリン比(TP及びAlbより算出)、尿素窒素(BUN、UV法)、クレアチニン量(CRN、酵素法)、血糖値(Glc、酵素法)、トリグリセライド量(TG、酵素法)、総コレステロール量(T-Cho、酵素法)、遊離コレステロール(F-Cho、酵素法)、総ビリルビン(Tbil、アゾビリルビン法)、アルカリフォスファターゼ活性値(ALP、Rate法)、トランスアミナーゼ活性値(A-T, AsT, Rate法)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -GT、Rate法)、カルシウム(Ca、OCPC法)、無機リン(P、モリブデン酸直接法)、ナトリウム、カリウム、クロール(Na, K, Cl、イオン電解質法)を日立7150型オートアナライザーを用いて測定した。

諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓および精巣(卵巣)については重量を測定した後に、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、精巣上体、子宮、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、眼球、皮膚およ

び筋肉等については摘出後直ちに 10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、常法に従いパラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施し、対照群と最高用量群について病理組織学的検索を行った。

5. 統計学的処理¹⁾

体重、血液学的・血清生化学的検査結果および臓器の絶対重量と相対重量については、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を、不等分散の場合は Kruscal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合は各群の例数が等しいことより、Dunnett 法により対照群と各群との有意差検定を行った。

結 果

1. 一般状態

試験期間を通して、いずれの群においても外見的 (皮膚、体毛など) 異常および被験物質投与に伴う一般状態への影響は認められなかった。また、すべての動物が試験終了時まで生存した。

2. 体重および摂餌量

試験期間中の雌雄ラットの体重および摂餌量の推移をそれぞれ Fig.1, Fig.2 に示した。また、試験期間中の平均摂

餌量および被験物質摂取量を Table 1 に示した。雌雄各群ともに体重、摂餌量に試験期間を通して対照群との間に大きな差は認められなかった。また試験期間中の平均摂餌量においても、雌雄とも対照群と被験物質投与群との間に大きな差はみられず、被験物質であるヘマトコッカス藻色素の摂取量も被験物質の用量段階にほぼ相関した。

3. 血液形態学的検査

血液学的検査の結果を Table 2,3 に示した。雄ではいずれの項目においても有意差および被験物質投与による変化は認められなかった。雌の H 群で対照群に比べ MCV, MCH の低下が有意に認められたが、いずれも投与用量との相関は認められなかった。

4. 血清生化学的検査

血清生化学的検査の結果を Table 4,5 に示した。雌では、T-Cho および F-Cho の上昇が H 群で有意に認められた。特に T-Cho の上昇はヘマトコッカス藻色素投与用量に相関しており、雄においても有意ではないが同様の傾向が認められた。雄ではこのほか、H 群で A/G 比, CRN および Na の減少、M 群で BUN の減少、L 群で CRN および Na の減少が有意に認められたが、いずれも用量に相関するものではなくまたその程度もわずかであった。

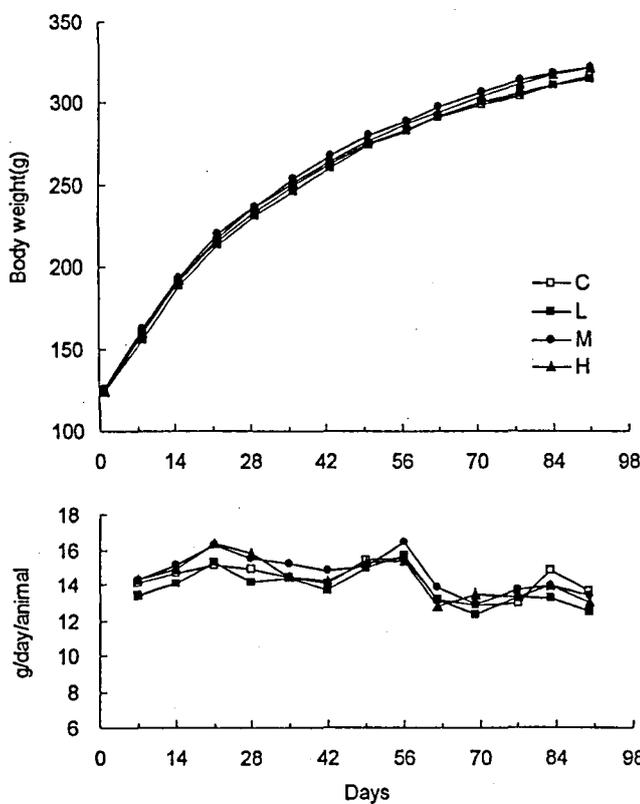


Fig.1. Body weight and food consumption curves of male F344 rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks; Dose levels of haematococcus color were C: 0 %, L: 0.025 %, M: 0.075 %, H: 0.25 %, respectively.

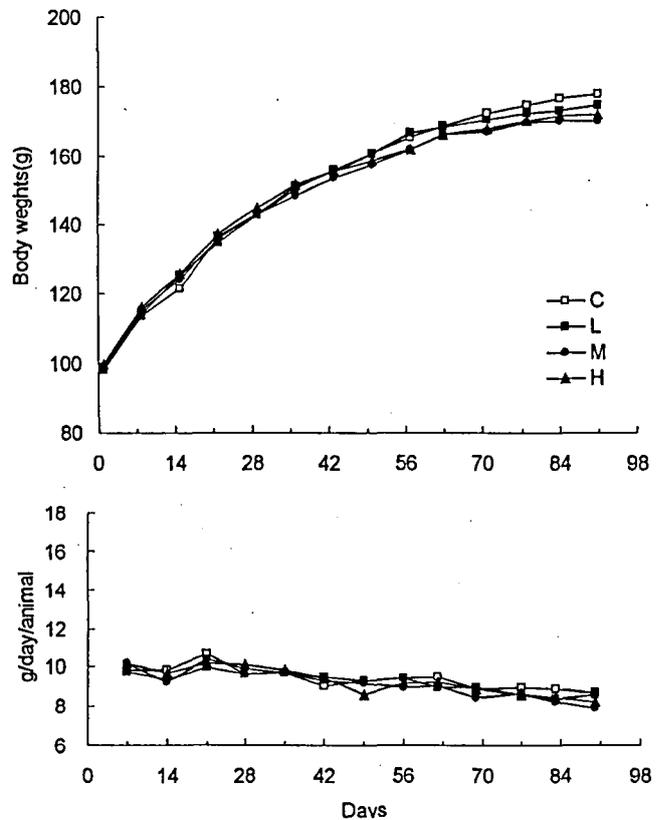


Fig.2. Body weight and food consumption curves of female F344 rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks; Dose levels of haematococcus color were C: 0 %, L: 0.025 %, M: 0.075 %, H: 0.25 %, respectively.

Table 1. Mean food consumption and haematococcus color intake in F344 rats

Sex	Group	No. of rats examined	Food consumption g/rat/day	Mean daily intakes of		Total intakes of haematococcus mg/kg/13 weeks
				Food g/kg/day	Haematococcus color mg/kg/day	
Male	C	10	14.2	60.9	0.0	0.0
	L	10	13.9	60.0	15.0	1364.0
	M	10	14.6	61.7	46.3	4208.9
	H	10	14.4	61.3	153.2	13941.1
Female	C	10	9.4	65.1	0.0	0.0
	L	10	9.3	64.1	16.0	1457.5
	M	10	9.2	64.0	48.0	4367.3
	H	10	9.5	66.1	165.2	15034.1

5. 臓器重量

剖検時の臓器重量の結果を Table 6,7 に示した。雌のM群で心臓の実重量の減少が有意に認められたほかには、対照群と比較して有意差もしくは用量相関性のある変化は雌雄ともに認められなかった。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的検索の結果を Table 8 に示した。雌雄ともにヘマトコッカス藻色素の摂取に依存すると思われる変化は認められなかった。また病理組織学的検査で散見された病変はいずれも既に自然発生病変として報告されているもので、その程度、頻度を考慮に入れるとこれら病変が被験物質投与により誘発されたものではないと考えられた。

考 察

ヘマトコッカス藻色素の安全性を確認するため、F344 ラットの混餌投与による 13 週間の亜慢性毒性試験を実施した。ヘマトコッカス藻色素製剤はヘマトコッカス藻色素原体を大豆油に 5% となるよう溶解したものであるが、本試験では大豆油による影響を除くためヘマトコッカス藻色素原体を用い、投与用量は予備試験の結果などから製剤として 5.0, 1.5 および 0.5% (ヘマトコッカス藻色素として 0.25, 0.075 および 0.025%) とした。試験期間を通じて、雌雄各群ともに順調に成育し被験物質投与に伴う皮膚、体毛など外見上の異常や一般状態への影響は認められなかった。体重や摂餌量に对照群と投与群で差は認められず、本色素の添加は摂餌行動や栄養状態に特に影響を及ぼさないことが示された。13 週投与後の血清生化学検査において、雌のH群で T-cho の上昇が有意に認められ、弱いながらも用量相関性が認められ、また雄においても同様の傾向が認められたが、変化の程度も軽度であることから毒性学的意義は乏しいものと考察された。ヘマトコッカス藻の主成分である

アスタキサンチンについてはコレステロール増加作用¹²⁾が報告されている。一方、本試験で用いたヘマトコッカス藻色素のアスタキサンチン (及びエステル体) 含有量は約 39% (data not shown) と低く、またアスタキサンチンを主成分としてヘマトコッカス藻色素よりも高濃度に含有するファフィア色素の 13 週間の亜慢性毒性試験¹³⁾においては、同様の変化は認められていないことから本試験における T-cho 上昇の機序は不明である。その他、血液形態学的検査や臓器重量には投与による変化は認められず、病理組織学的検査において認められた雄の心筋炎および腎臓の鉍質沈着等はいずれも対照群においても発生し、また F344 ラットでの自然発生病変として報告されているものであることなどからヘマトコッカス藻色素の投与により誘発されたものではないと考察された。本色素と同様にアスタキサンチンを主成分とするファフィア色素では、F344 ラットへの 13 週間混餌投与により最高 5.0% で毒性は示されていない。¹³⁾ 今回のヘマトコッカス藻色素についても、いずれの投与群においても摂餌量および体重増加への影響はなく、また血液形態学的および血清生化学検査、臓器重量および病理組織学的にも投与に伴う明らかな毒性所見は認められなかったことから、ラットでの混餌投与によるヘマトコッカス藻色素の毒性は極めて低いものと考察された。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課編：食品衛生法改正に伴う既存添加物名簿関係法令通知集，社会保険出版社，東京，pp5-25, pp83-169 (1996)
- 2) Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M. and Utsumi, K.: *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, **22**, 27-38 (1990)
- 3) Rousseau, E. J., Davison, A. J. and Dunn, B.: *Free. Radic. Biol. Med.*, **13**, 407-33 (1992)
- 4) Palozza, P. and Krinsky, N.I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291-5 (1992)

Table 2. Hematological data of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	9.55 ± 0.31	9.68 ± 0.22	9.67 ± 0.18	9.68 ± 0.20
Hb	g/dl	16.1 ± 0.3	16.1 ± 0.3	16 ± 0.2	16.1 ± 0.3
Ht	%	45.3 ± 1.6	45.9 ± 1	45.8 ± 0.8	45.7 ± 1.1
MCV	fl	47.5 ± 0.4	47.4 ± 0.4	47.3 ± 0.5	47.2 ± 0.4
MCH	pg	16.8 ± 0.6	16.6 ± 0.1	16.6 ± 0.3	16.6 ± 0.2
MCHC	g/dl	35.5 ± 1.4	35.1 ± 0.3	35.1 ± 0.4	35.2 ± 0.4
Plt	10 ¹² /l	0.54 ± 0.11	0.51 ± 0.07	0.5 ± 0.08	0.49 ± 0.13
WBC	10 ⁹ /l	6.51 ± 1.11	6.78 ± 0.89	6.61 ± 1.1	7.16 ± 1.3
Neut-B	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Base	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino	%	0.8 ± 0.7	1.1 ± 0.8	1 ± 0.7	1 ± 0.5
Neut-S	%	16.4 ± 3.1	16.4 ± 5.6	17.5 ± 4.1	19.4 ± 6.1
Lympho	%	81 ± 4.1	80.3 ± 5.5	78.9 ± 2.9	77.1 ± 7
Mono	%	1.9 ± 1.4	2.2 ± 0.9	2.7 ± 1.3	2.5 ± 1.4

Values represent mean ± S.D..

Table 3. Hematological data of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	8.88 ± 0.26	8.93 ± 0.28	8.95 ± 8.17	8.93 ± 0.18
Hb	g/dl	15.8 ± 0.4	15.8 ± 0.5	15.8 ± 0.3	15.7 ± 0.3
Ht	%	44.2 ± 1.3	44.3 ± 1.3	44.4 ± 0.8	44.1 ± 1.0
MCV	fl	49.8 ± 0.3	49.6 ± 0.2	49.6 ± 0.3	49.3 ± 0.2 **
MCH	pg	17.8 ± 0.1	17.7 ± 0.1	17.7 ± 0.2	17.5 ± 0.1 **
MCHC	g/dl	35.7 ± 0.3	35.6 ± 0.3	35.6 ± 0.3	35.6 ± 0.2
Plt	10 ¹² /l	0.48 ± 0.12	0.47 ± 0.12	0.47 ± 0.05	0.48 ± 0.09
WBC	10 ⁹ /l	5.49 ± 0.72	4.62 ± 0.68	5.35 ± 1.01	5.16 ± 0.89
Neut-B	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Base	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino	%	1.3 ± 0.7	1.4 ± 1.0	1.1 ± 1.1	1.1 ± 0.6
Neut-S	%	19.0 ± 3.7	18.0 ± 4.0	16.3 ± 4.0	16.0 ± 3.4
Lympho	%	77.4 ± 3.8	79.3 ± 4.2	80.7 ± 4.0	81.2 ± 3.5
Mono	%	2.3 ± 1.3	1.3 ± 0.9	2.0 ± 0.8	1.7 ± 0.8

Values represent mean ± S.D..

** show significant difference from the control groups at p<0.01.

Table 4. Serum biochemical data of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.13 ± 0.13	6.14 ± 0.16	6.19 ± 0.08	6.15 ± 0.14
Alb	g/dl	3.92 ± 0.12	3.93 ± 0.08	3.92 ± 0.05	3.85 ± 0.07
A/G		1.77 ± 0.09	1.78 ± 0.06	1.73 ± 0.05	1.68 ± 0.06 *
BUN	mg/dl	21.4 ± 1.6	20.8 ± 0.8	19.8 ± 1.1 *	20.2 ± 1.2
CRN	mg/dl	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01 **
Glc	mg/dl	119 ± 12	120 ± 6	119 ± 8	121 ± 9
TG	mg/dl	133 ± 37	142 ± 38	128 ± 37	139 ± 24
TCho	mg/dl	64 ± 5	64 ± 5	65 ± 6	68 ± 3
FCho	mg/dl	11.9 ± 1.3	11.9 ± 1.7	11.5 ± 1.5	12.3 ± 0.8
TBil	mg/dl	0.04 ± 8.8	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
AIP	mU/ml	228 ± 20	227 ± 21	218 ± 11	218 ± 15
AIT	mU/ml	57 ± 5	58 ± 10	55 ± 4	59 ± 4
AsT	mU/ml	88 ± 18	84 ± 15	84 ± 12	90 ± 13
γ-GT	mU/ml	0.22 ± 0.29	0.17 ± 0.3	0.12 ± 0.15	0.18 ± 0.17
Ca	mg/dl	10.3 ± 0.1	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.4 ± 0.1
P	mg/dl	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.4	5.5 ± 0.6
Na	mEq/l	139 ± 2	139 ± 1	139 ± 1	138 ± 1
K	mEq/l	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.3	5 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Cl	mEq/l	101 ± 4	102 ± 1	101 ± 2	101 ± 2

Values represent mean ± S.D..

* and ** show significant difference from the control groups at p<0.05 and p<0.01, respectively

Table 5. Serum biochemical data of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.04 ± 0.13	5.96 ± 0.15	6.05 ± 0.14	5.93 ± 0.11
Alb	g/dl	4.01 ± 0.11	3.96 ± 0.1	4.05 ± 0.11	4.01 ± 0.08
A/G		1.99 ± 0.12	1.98 ± 0.1	2.03 ± 0.09	2.09 ± 0.07
BUN	mg/dl	18.1 ± 1.5	19.1 ± 1.2	19 ± 1.5	17.7 ± 1.4
CRN	mg/dl	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Glc	mg/dl	110 ± 7	113 ± 7	112 ± 7	109 ± 10
TG	mg/dl	83 ± 20	80 ± 16	76 ± 18	82 ± 24
TCho	mg/dl	91 ± 6	92 ± 10	98 ± 8	107 ± 6 **
FCho	mg/dl	20.2 ± 1.3	19.7 ± 2.6	21.5 ± 2.4	22.8 ± 1.6 *
TBil	mg/dl	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02
AIP	mU/ml	138 ± 11	153 ± 11	143 ± 15	147 ± 14
AIT	mU/ml	40 ± 3	39 ± 2	40 ± 3	40 ± 4
AsT	mU/ml	83 ± 10	81 ± 11	85 ± 10	78 ± 6
γ-GT	mU/ml	0.32 ± 0.32	0.13 ± 0.16	0.10 ± 0.14	0.37 ± 0.40
Ca	mg/dl	10.1 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.2
P	mg/dl	4.0 ± 0.6	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.7
Na	mEq/l	138 ± 1	137 ± 1	137 ± 1	138 ± 1
K	mEq/l	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2
Cl	mEq/l	102 ± 1	101 ± 1	102 ± 1	102 ± 1

Values represent mean ± S.D..

* and ** show significant difference from the control groups at p<0.05 and p<0.01, respectively

Table 6. Organ weights of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
Absolute					
Body Weights	g	310.65 ± 9.34	308.24 ± 10.15	315.69 ± 10.8	315.48 ± 11.12
Brain	g	1.931 ± 0.051	1.92 ± 0.062	1.932 ± 0.059	1.917 ± 0.048
Heart	g	0.884 ± 0.034	0.899 ± 0.059	0.894 ± 0.057	0.909 ± 0.054
Lungs	g	0.967 ± 0.056	0.923 ± 0.047	0.933 ± 0.035	0.941 ± 0.029
Liver	g	7.12 ± 0.419	7.088 ± 0.288	7.308 ± 0.376	7.15 ± 0.227
Kidney	g	1.732 ± 0.064	1.725 ± 0.089	1.791 ± 0.087	1.779 ± 0.061
Spleen	g	0.571 ± 0.026	0.573 ± 0.021	0.569 ± 0.029	0.559 ± 0.021
Testes	g	3.003 ± 0.079	2.945 ± 0.119	2.943 ± 0.081	2.943 ± 0.102
Adrenal	mg	32.41 ± 3.49	32.25 ± 4.12	34.21 ± 3.22	33.52 ± 2.83
Thymus	mg	204.51 ± 54.71	202.08 ± 46.27	185.95 ± 40.44	199.16 ± 38.71
Relative					
Brain	g%	0.622 ± 0.025	0.622 ± 0.023	0.613 ± 0.028	0.608 ± 0.019
Heart	g%	0.283 ± 0.011	0.29 ± 0.018	0.284 ± 0.017	0.287 ± 0.014
Lungs	g%	0.311 ± 0.02	0.299 ± 0.014	0.294 ± 0.011	0.299 ± 0.011
Liver	g%	2.29 ± 0.087	2.299 ± 0.062	2.315 ± 0.068	2.267 ± 0.06
Kidney	g%	0.558 ± 0.016	0.559 ± 0.016	0.566 ± 0.021	0.564 ± 0.022
Spleen	g%	0.182 ± 0.01	0.186 ± 0.007	0.179 ± 0.009	0.177 ± 0.008
Testes	g%	0.967 ± 0.038	0.954 ± 0.039	0.933 ± 0.046	0.934 ± 0.037
Adrenal	mg%	10.45 ± 1.24	10.48 ± 1.39	10.84 ± 1.12	10.64 ± 1.03
Thymus	mg%	65.62 ± 16.44	65.26 ± 13.08	59.02 ± 13.66	63.28 ± 13.29

Values represent mean ± S.D..

Table 7. Organ weights of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
Absolute					
Body Weights	g	172.19 ± 5.46	170.53 ± 7.06	165.33 ± 9.01	166.86 ± 4.06
Brain	g	1.78 ± 0.02	1.787 ± 0.037	1.769 ± 0.029	1.782 ± 0.036
Heart	g	0.567 ± 0.029	0.548 ± 0.018	0.532 ± 0.024 **	0.555 ± 0.028
Lungs	g	0.71 ± 0.044	0.7 ± 0.042	0.676 ± 0.034	0.675 ± 0.046
Liver	g	3.658 ± 0.205	3.735 ± 0.229	3.612 ± 0.175	3.708 ± 0.184
Kidney	g	1.049 ± 0.062	1.063 ± 0.069	1.032 ± 0.055	1.054 ± 0.044
Spleen	g	0.370 ± 0.02	0.367 ± 0.026	0.355 ± 0.021	0.347 ± 0.018
Ovaries	g	48.72 ± 11.41	48.31 ± 8.44	49.19 ± 7.78	49.72 ± 5.24
Adrenal	mg	38.32 ± 4.67	39.44 ± 4.83	35.50 ± 4.41	37.64 ± 4.51
Thymus	mg	167.11 ± 24.53	168.28 ± 25.31	164.76 ± 16.85	152.67 ± 23.88
Relative					
Brain	g%	1.035 ± 0.04	1.047 ± 0.034	1.072 ± 0.052	1.069 ± 0.039
Heart	g%	0.329 ± 0.014	0.322 ± 0.014	0.323 ± 0.013	0.333 ± 0.016
Lungs	g%	0.412 ± 0.026	0.411 ± 0.03	0.409 ± 0.023	0.406 ± 0.034
Liver	g%	2.126 ± 0.119	2.192 ± 0.121	2.187 ± 0.10	2.223 ± 0.12
Kidney	g%	0.609 ± 0.036	0.624 ± 0.037	0.624 ± 0.027	0.633 ± 0.031
Spleen	g%	0.214 ± 0.01	0.215 ± 0.011	0.215 ± 0.018	0.206 ± 0.012
Ovaries	g%	28.34 ± 6.68	28.22 ± 4.18	29.83 ± 5.00	29.81 ± 3.25
Adrenal	mg%	22.24 ± 2.47	23.18 ± 3.14	21.49 ± 2.62	22.54 ± 2.53
Thymus	mg%	97.02 ± 13.75	98.57 ± 13.37	99.69 ± 9.05	91.71 ± 15.46

Values represent mean ± S.D..

** show significant difference from the control groups at p<0.01.

Table 8. Histological findings in male and female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Sex Group	Male		Female	
	C	H	C	H
No. of animals examined	10	10	10	10
Heart				
Myocardial degeneration	1	2	0	0
Intramyocardial cell infiltration	1	0	0	0
Lung				
Microgranuloma	1	0	0	1
Liver				
Extratmedullary hematopoiesis	1	0	0	0
Microgranuloma	1	4	3	1
Vacuolation of hepatocyte	0	1	0	0
Kidney				
Tubular regeneration	2	2	0	0
Hyalin droplet	10	10	0	0
Calcification of collecting tubule	1	0	0	0
Calcification at cortico-medullary junction	0	0	0	1
Hyalin cast	0	1	0	0
Pancreas				
Vacuolation of acinar cell	1	0	0	1
Spleen				
Microgranuloma	0	0	1	0
Adrenal gland				
Accessory adrenal gland	1	1	0	1
Dilatation of sinusoid	0	0	1	1

- 5) Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y. and Gross, M.D.: *J. Nutr.*, **125**, 2483-92 (1995)
- 6) Jyonouchi, H., Zhang, L. and Tomita, Y.: *Nutr. Cancer.*, **19**, 269-80 (1993)
- 7) Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A.: *Cancer. Res.*, **55**, 4059-64 (1995)
- 8) Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A.: *Carcinogenesis*, **16**, 2957-63 (1995)
- 9) 日本水産、ヤエガキ醱酵技研：アスタキサンチン産生微生物を用いた色素生産技術の開発，フードデザイン技術研究組合，東京，pp215-247 (1994)
- 10) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針，日本食品添加物協会，東京，pp19-22 (1986)
- 11) 山崎実，野口雄次，丹田勝，新谷茂：武田研究所報，**40**，163-187 (1981)
- 12) Murillo, E.: *Arch. Latinoam. Nutr.*, **42**, 409-13 (1992)
- 13) Onodera, H., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 99-106 (1997)